

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

学号: BH17000050

国家海洋局第三海洋研究所

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

对虾 integrin 介导白斑杆状病毒感染以及

日本对虾凝集素表达及功能研究

李 登 峰

合作导师: 徐 洵 教授

李少菁 教授

工作完成日期 2004 年 12 月-2006 年 12 月

报告提交日期 2006 年 12 月 20 日

国家海洋局第三海洋研究所

厦门大学

2006 年 12 月

对虾 integrin 介导白斑杆状病毒感染以及

日本对虾凝集素表达及功能研究

Shrimp integrin mediates white spot syndrome virus entry  
and expression, characterization of shrimp lectins

李 登 峰

流动站（一级学科）名称 厦门大学海洋科学博士后流动站

专 业（二级学科）名称

研究工作起始时间 2004 年 12 月 19 日

研究工作期满时间 2006 年 12 月 19 日

厦 门 大 学

国家海洋局第三海洋研究所

2006 年 12 月

# 厦门大学、国家海洋局第三海洋研究所

## 博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学、国家海洋局第三海洋研究所有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学、国家海洋局第三海洋研究所有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图、海洋三所图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（√）， 2、不保密（ ）

纸本在 2008 年解密后适用本授权书；

电子版在 2009 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 李登峰 日期： 2006 年 12 月 25 日

导师签名： 日期： 年 月 日

# 国家海洋局第三海洋研究所

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确的方式注明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：李登峰

日期： 2006 年 12 月 19 日

# 摘 要

对虾是主要的水产养殖对象，爆发性疾病的持续发生给对虾养殖业造成了巨大损失，对虾白斑杆状病毒 WSSV 是对虾的主要病原。宿主细胞受体及免疫因子与病毒的相互识别、相互作用对病毒的感染及宿主防御至关重要。迄今尚无有关 WSSV 与对虾细胞受体、免疫因子间相互作用的文献报道。

粘合素 integrin 是细胞表面的主要受体，介导多种病毒尤其是具有囊膜的病毒的感染。WSSV 多种结构蛋白含有 integrin 结合配基。本文对对虾  $\beta$ -integrin 细胞膜外功能区进行了克隆表达、纯化。以纯化的 integrin 为 Bait 对 WSSV 基因组噬菌体展示库进行筛选，获得四种克隆子。免疫共沉淀实验证明其中三种与 integrin 能够结合。这三种克隆子分别表达 WSSV 的膜蛋白 Vp187 (wsv209)，vp136A (wsv271) 和 ORF wsv049。内源蛋白的免疫共沉淀进一步证明了天然 integrin 与 VP187 间的结合。Vp187 含有两个 integrin 的结合基序 (-RGD and KGD)，vp136A 含有一个 RGD，wsv049 含有一个 DLIRL。人工感染实验中可溶性 integrin、integrin 抗体、RGD 能够抑制 WSSV 感染。sRNA 干扰 integrin 表达时对虾及对虾血淋巴细胞对 WSSV 的易感性降低。结果表明 integrin 参与了 WSSV 的感染，这是首次发现的与 WSSV 感染有关的对虾细胞受体。

无脊椎动物缺乏免疫球蛋白等高度特异性免疫因子，为了保护自身必须形成强大的能够识别多种多样异物的机制，因此对其免疫识别因子的寻找一直是国内外许多学者的研究重点之一。但迄今尚无对虾

防御因子与病毒识别、相互作用的报道。凝集素品种繁多、数目庞大、无处不在。它在对外来入侵活动进行的异物识别、防御、凝集、吞噬、包囊及其随后的创伤修复等一系列反应中，起着重要作用。迄今只有少数文献对个别对虾凝集素进行研究报告。本文用 WSSV 主要结构蛋白 VP26、VP28、VP281、VP466 和对虾细胞受体 integrin 筛选对虾 cDNA 噬菌体展示库，并由此获得多种具有 CTLD(C-type lectin domain)结构的蛋白 cDNA 序列。分析了该类对虾免疫因子的 cDNA 序列多样性，并对其进行了表达纯化及功能分析。首次在无脊椎动物中发现凝集素与病毒及细胞受体间的作用，首次发现对虾凝集素能阻断 WSSV 侵入对虾血淋巴细胞，该结果与脊椎动物中凝集素能通过阻断细胞受体与病毒接触、结合而阻止病原入侵的理论一致。首次发现 WSSV 膜蛋白 VP281 对脊椎动物细胞的凝集活性、发现病毒结构蛋白、细胞受体 integrin 与对虾凝集素的拮抗作用。这些发现丰富了无脊椎动物免疫相关理论，为对虾病害防治工作的开展奠定了基础。

关键词：对虾、白斑杆状病毒、粘合素、凝集素

# Abstract

Shrimp is one of the most important species in aquaculture, but shrimp farming industry has been puzzled by infectious diseases especially by virus diseases in the world since 1990's. White Spot Syndrome Virus (WSSV) is the major viral pathogen of farmed shrimp causing disastrous economic losses widely. Although remarkable progress has been made in characterizing the WSSV, information concerning the interaction between the virus and membrane receptor of host cell, immune factor of host is still absent.

The adhesion molecule, integrins were found to act as cellular receptors for kinds of virus especially that contain envelope protein with integrin-binding motif. Envelope proteins with GRD motifs were found to be involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in previous studies. To investigate the function of integrin in the internalization of WSSV, we screened the WSSV whole genome phage display library with a beta integrin segment of shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Three selected clones exactly matched WSSV envelope protein vp187, vp136A and WSV049 respectively which contain one or two integrin-binding ligands. Infection-blocking assays revealed that soluble integrin, integrin-specific antibody, peptide RGD and siRNA RNA interference targeting integrin inhibited WSSV infection in vitro and in vivo. These

identify that integrin mediates cell entry of WSSV. Integrin is the first receptor been found to mediate WSSV infection.

Developing strong recognition system is essential for invertebrate without T-cell receptors and antibodies. Thus far, no interaction between shrimp immune factor and virus has been reported. Lectin superfamily, as major pattern recognition molecule, plays important role in immunity. Yet only few shrimp lectins had been studied separately. In this paper, shrimp integrin and VP26、VP28、VP281、VP466 of WSSV was used as bait to screen shrimp cDNA T7 library. 9 cDNA coding proteins (Pjlecs) containing C-type lectin domain (CTLN) were obtained. The diversity of the cDNA sequences of the Pjlecs was analyzed. The Pjlecs were expressed and the functions of them were studied.

**Keywords:** shrimp, white spot syndrome virus (WSSV), integrin, lectin



# 目 录

前 言 .....	1
1. 研究背景概况 .....	1
2. 病毒受体及粘合素 integrin .....	2
2.1. 病毒受体 .....	2
2.2 粘合素 integrin .....	3
3. 凝集素 .....	4
4. 研究的目的、意义 .....	7
第一部分 对虾细胞受体 integrin 介导对虾白斑杆状病毒感染 .....	8
材料与方法 .....	9
1. Integrin、GST、抗体制备及短肽合成 .....	9
1.1 Integrin、GST 制备 .....	9
1.2. 抗体制备 .....	9
1.3 短肽 .....	9
2. 对虾、螯虾血淋巴制备 .....	10
3. WSSV 病毒粒子制备 .....	10
3.1. 完整 WSSV 病毒粒子制备 .....	10
3.2. WSSV 病毒粒子的标记 .....	10
3.3 WSSV 膜蛋白制备: .....	10
4. WSSV 基因组噬菌体展示库筛选 .....	11
4.1. WSSV 基因组噬菌体展示库 .....	11
4.2. 基因组 M13 噬菌体库的扩增及噬菌体库原种的制备 .....	11
4.2.1 辅助噬菌体 M13K07 .....	11
4.2.2 WSBV 基因组 M13 噬菌体库的扩增及噬菌体库原种的制 备 .....	11
4.3. WSSV 基因组噬菌体展示库筛选 .....	11
4.4. 阳性克隆子的序列测定及分析 .....	12
5. 由重组噬菌体制备可溶性蛋白 .....	13

6. 免疫共沉淀 .....	13
6.1. 重组蛋白的免疫共沉淀 .....	13
6.2. 内源蛋白的免疫共沉淀 .....	14
7. 感染阻断实验 .....	14
7.1 体内阻断实验 .....	14
7.2 体外阻断实验 .....	15
7.2.1 体外阻断实验方法一 .....	15
7.2.2 体外阻断实验方法二 .....	16
8. RNAi .....	16
8.1 设计合成单链 Oligo DNA (合成由 TaKaRa 公司, 完成) ....	16
8.2. 双链 Oligo DNA 的制备 .....	18
8.3. 体外转录合成 siRNA .....	18
8.4 核酸酶处理 .....	20
8.5. siRNA 的纯化 .....	20
8.6. RNA 干扰 .....	21
8.6.1. 体内 RNA 干扰 .....	21
8.6.2. 体外 RNA 干扰 .....	22
结    果 .....	22
1. WSSV 基因组噬菌体展示库筛选及序列分析 .....	22
1.1 日本囊对虾 integrin 序列 .....	22
2.2 WSSV 基因组噬菌体库筛选 .....	23
2. 免疫共沉淀 .....	24
3. 感染阻断实验 .....	25
3. RNA 干扰 .....	26
讨    论 .....	30
附件 A: 辅助噬菌体制备、噬菌体库扩增、噬菌体库原种制备及噬菌体库筛 选用的试剂 .....	32
附件 B: 高滴度辅助噬菌体原种的制备 .....	34
附件 C: WSBV 基因组 M13 噬菌体库的扩增、噬菌体库原种的制备 .....	35

附件 D: 感受状态 TG1 的制备 .....	36
第二部分 日本囊对虾多种具 CTLD 结构域凝集素的研究 .....	37
材料与方法 .....	38
1. 材料 .....	38
1.1. 实验动物 .....	38
2. 2. 试剂: .....	38
2. 3 噬菌体展示库 .....	38
2. 方法 .....	39
2.1. 日本囊对虾 PjLecs cDNA 序列的获得及分析 .....	39
2.2. 蛋白表达纯化 .....	39
2.2.1 引物 .....	39
2.2.2 表达 .....	40
2.3. 抗体制备 .....	40
2.4. PjLecs 的凝集活性检测试验 .....	41
2.4.1 对哺乳动物红细胞的凝集活性试验 .....	41
2.4.2 对细菌及酵母的凝集活性试验 .....	41
2.5. 凝集抑制试验: .....	42
2.6 对对虾淋巴细胞吞噬作用的调理试验 .....	42
2.7 细胞毒活性检测 .....	43
2.6 完整病毒 (WSBV) 粒子的粗提和感染抑制试验 .....	43
结    果 .....	44
1. 日本囊对虾 PjLecs cDNA 序列 .....	44
2. 蛋白的表达纯化 .....	45
3. PjLecs 的凝集活性 .....	46
3.1. PjLecs 对哺乳动物红细胞的凝集活性 .....	46
3. 2. PjLecs 对细菌及酵母的凝集活性 .....	47
3.3 凝集抑制试验: .....	48
3.4 对淋巴细胞吞噬的调理 .....	51
3.5 细胞毒活性 .....	51

3.6 病毒感染抑制试验.....	53
讨 论.....	53
附件： 其他相关实验结果.....	63
参考文献.....	69
致 谢.....	82
博士后期间发表的学术论文、专著：.....	83
博士后期间主持、参加的课题：.....	83
博士后期间申请的专利：.....	84
个人简历：.....	85
联系地址：.....	85

厦门大学博硕士论文摘要库

# 前 言

## 1. 研究背景概况

对虾在分类上属于节肢动物门，甲壳纲。因味道鲜美，营养丰富，而深受人们的喜爱。其生长快，分布范围广，养殖周期短，产量高，见效快，经济效益明显是海产品中产值最高的养殖品种之一。自 20 世纪 70 年代开始，随着养殖技术的推广，对虾养殖业在世界范围内迅速发展，虾类人工养殖获得了巨大收益。但自 20 世纪 90 年代以来，对虾病害尤其是爆发性病毒病的持续爆发，给水产养殖业造成了巨大损失（蔡生力, 2002）。

针对疾病的发生，人们采取了多种防治措施包括改进养殖方式、改换养殖品种、大量使用抗生素或化学药物、良种选育等(Bachere 等, 2004)。这些措施虽然在一定程度上使情况得到改善，但无法解决根本问题，对虾爆发性病毒病仍然持续发生并造成严重损害。抗生素及化学药物的滥用严重污染了养殖水域环境、危害着人类健康。新养殖品种的引入带来了新型致病性病毒。由于缺乏对虾防御相关基因的研究背景，良种选育多单纯采用表观性状筛选而造成误选或性状不稳定。

在基础研究方面，科学家们从病原的角度进行了较为深入系统的研究，包括病原学、病理学、流行病学及病原检测技术建立等。而在病原入侵机制及对虾防御机制方面，研究水平远较高等动物落后。与陆生高等动物比，对虾生活在更为复杂的环境中，水体中存在着大量

病原生物。正常情况下对虾能保持健康，在疾病爆发时也总有少量对虾不感染或感染后无症状而存活下来，这是由于其体内防御系统有效工作的结果。对病原入侵机制及对虾防御相关因子深入开展研究，针对性地开发新型环保型药物，是开展对虾抗病相关研发的必然途径。越来越多的人已经意识到这一点，近年来，对虾防御系统研究已成为新的研究热点，并卓有成效，较为突出的工作有：瑞典 Soderhall 对酚氧化酶系统、法国 Destoumieux 对抗菌肽、德国 Heinz Decke 对这两方面都开展了较为深入的研发工作(Van 等, 2002; Keteles 等, 2001; 张小华等, 1998 ; Söderhäll 等, 1999)。本实验室对对虾抗病毒蛋白因子斑节对虾 C 型凝集素样蛋白 PMAV 和日本对虾蛋白酶抑制剂 (PI) 样蛋白进行了较为深入的研究 (Romo-Figueroa et., 2004 ; Alpuche et., 2005 ; Liu et., 2003, 2007; Luo et., 2007)。

但是在主要致病病原——白斑杆状病毒 WSSV 的入侵机制，特别是对虾的细胞受体与 WSSV 相互识别、介导病毒入侵方面却尚无实质性进展。此外，对于无脊椎动物重要的防御因子凝集素或具典型凝集素样结构域的蛋白的研究也不深入全面，只有少量论文发表，且这些论文多分散地对几种对虾的个别凝集素进行研究。迄今，尚无任何文献报道有关对虾序列多样性及功能比较的研究。

## **2. 病毒受体及粘合素 integrin**

### **2.1. 病毒受体**

病毒受体是指能特异性地与病毒结合，介导病毒内化，并促进病

毒感染的宿主细胞膜组分，是病毒宿主范围、组织细胞嗜性的一个决定因素(Haywood 1994)。病毒受体是引发病毒感染宿主细胞的主要决定因素，病毒必需与受体识别、相互作用才能结合和进入宿主细胞，启动病毒的生命循环。与激素受体有相似，病毒受体具有特异性、亲和性、受体位点有限性、靶细胞部位的局限和生物学效应等基本特征。病毒受体特异性或强或弱，有时不同病毒选择同一受体，有的病毒则有一个以上的受体。对于某些病毒而言病毒受体由一个以上膜组分形成，即存在主要受体及辅助因子。病毒受体的确定应包括如下两方面的内容：① 受体存在时病毒能感染，受体缺失或被阻断如抗体中和或配基竞争抑制时，病毒感染受阻；② 病毒与受体存在相互作用

研究病毒受体可以从分子水平阐明病毒的感染机制，为阐明病毒致病机理奠定分子基础，为新型抗病毒药物的研发及疾病防治工作的开展奠定基础。正因为病毒受体研究具有重要的意义，与病毒受体有关的研究包括探明病毒受体组分等已成为病毒学研究的热点。

## 2.2 粘合物 integrin

粘合物 integrin 是细胞膜表面的一类重要的细胞黏附分子，最初于1986年提出，是膜受体超家族，由不同的  $\alpha$ 、 $\beta$  亚单位组成异源二聚体。 $\alpha$  和  $\beta$  亚单位均由胞膜外区、胞浆区、穿膜区三部分组成。粘合物分子在体内分布很广泛，多数粘合物分子可以表达于多种组织细胞，其配基具有多样性主要有 RGD、KGD、DLIRL、DGEA、EILDV、GPRP、KQAGDV、EILDV 等短肽序列。Integrin 与细胞外配体的相互作



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库